微生物谷氨酰胺转氨酶催化细胞色素 C 赖氨酸残基的定点修饰

张宸[1]，陈韶华[2]，吴文倩[2]，周建芹[1]*
1 苏州大学医学部药学院，江苏苏州 215123，2 苏州大学医学部实验中心，江苏苏州 215123

摘　要：研究微生物谷氨酰胺转氨酶（mTG）催化细胞色素 C（Cyt C）的 PEG 定点修饰的可行性，并优化修饰条件，研究 PEG 修饰对 Cyt C 性质的影响。将单甲氧基聚乙二醇氨（mPEG-NH_2）与 *N*-苄氧羰基-谷氨酰胺-甘氨酸（CBZ-QG）共价结合制备含谷氨酰胺残基的甲氧基聚乙二醇衍生物（*N*-苄氧羰基-谷氨酰胺-甘氨酰-单甲氧基聚乙二醇，CBZ-QG-mPEG）；mTG 分别催化 mPEG-NH_2、CBZ-QG-mPEG（mTG）修饰 Cyt C，研究酶法定点修饰 Cyt C 残基的可行性；改变酶的用量、温度、反应时间和 pH 值等反应条件优化谷胺酰胺转氨酶催化修饰 Cyt C 的条件。研究结果表明：（1）mPEG-NH_2 不能作为 mTG 的底物修饰 Cyt C，甲氧基聚乙二醇氨（mPEG-NH_2）分子上引入谷氨酰胺残基后，在 mTG 的催化作用下了实现 Cyt C 的 PEG 修饰，而且基于 mTG 的底物特异性实现了 PEG 定点修饰 Cyt C 的赖氨酸残基；（2）37°C 温度下，pH 值 8.0 的溶液中，1 mg/mL 的 mTG 催化修饰反应 2 h 是最佳修饰反应条件；（3）化学法 PEG 修饰 Cyt C 产物复杂，是多种多点修饰产物的混合物，酶法催化 PEG 修饰 Cyt C 只产生单一产物；（4）与天然 Cyt C 相比，修饰后 Cyt C 的活力、稳定性都有所提高。本研究提出的谷胺酰胺转胺酶催化修饰法解决了蛋白质 Lys 残基难以定点修饰的难题，拓展了 mTG 在蛋白质修饰方面的应用。

关键词：谷胺酰胺转氨酶，细胞色素 C，　定点修饰

Modifiation of cytochrome c at the level of lysine residues mediated by microbial transglutaminase

Zhang Chen[1], Chen[2] Shao-hua, Wu Wen-qian[2], Zhou Jian-qin[1]*
1 College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, P. R. China
2 Experimental center of medical College, Soochow University, Suzhou 215123, P. R. China

Abstract：Experiments were carried out to investigate the possibilities of site specific PEGylation of therapeutic proteins (cytochrome c, Cyt C) catalyzed by mTG. Then reaction conditions were optimized and the properties of the PEGylated Cyt C were explored. CBZ-QG-mPEG was successfully synthesized by introducing CBZ-QG into methoxypolyethylene glycol amine (mPEG-NH_2) and could act as the acyl donor of mTG. The possibilities of mPEG-NH_2 acting as an amino donor or CBZ-QG-mPEG acting as an acyl donor to modify Cyt C catalyzed by mTG were investigated. CBZ-QG-mPEG was coupled to the specific Lys residue of Cyt C catalyzed by mTG. The optimized PEGylation conditions were as follows: 37°C, pH 8.0, mTG 1.0 mg/mL, reaction time 2h. The PEGylated Cyt C exhibited better thermal stability and pH stability than the native Cyt C. Only one specific Lys residue of Cyt C was PEGylated catalyzed by mTG, while several Lys residues of cyt C were conjugated with mPEG-SPA by using the chemical method, which leading to the heterogeneity of the derivatives. The prominent

Key words：transglutaminase, cytochrome c, site specific modification

通讯作者：周建芹，电子邮箱：zhoujianqin@suda.edu.cn，苏州大学药学院副教授，联系电话：13771916275

advantage of mTG-mediated catalysis is its high site specificity and thus homogeneity. Here, the mTG-mediated PEGylation of proteins at the level of lysine (Lys) residues was developed, which overcome the random modification of Lys residues by the chemical method and was expected to be generally applied to protein modification.

细胞色素 C（Cytochrome C，简称 Cyt C）是一种以铁卟啉为辅基的呼吸酶，广泛存在于各种具有线粒体的生物中，它参与生物呼吸链中的电子传递[1]。作为药物，静脉注射 Cyt C 用于急救或者辅助治疗各种原因引起的组织缺氧，如一氧化碳中毒、催眠药中毒、新生儿窒息、严重休克缺氧、麻醉及肺部疾病引起的呼吸困难、高山缺氧、脑缺氧、心脏疾病引起的缺氧等。但是，Cyt C 一般从动物的心脏中分离，作为药物注射到身体中会引起人的免疫反应，如局部痉挛、皮疹、发热、口渴及暂时性休克等反应。PEG 修饰蛋白质药物是降低蛋白质药物过敏反应最常用最有效的方法之一。另外，Cyt C 在体外也是一种非常好的生物催化剂，可以催化多种反应，如羟化反应和芳香族化合物的氧化反应等[2]。将 Cyt C 进行 PEG 修饰后，Cyt C 的活性中心会发生变化，催化特性也随之发生变化。PEG 修饰的 Cyt C 能够催化 20 种芳香族化合物中的 17 种发生氧化反应，而未修饰的 Cyt C 只能催化其中 8 种发生氧化反应[2]。总之， PEG 修饰 Cyt C 能够消除其作为药物在体内引起的免疫反应，能够改变其作为催化剂在体外的催化特性。

PEG 修饰蛋白质分子通常采用化学反应法修饰多肽链中的赖氨酸（Lys）残基。然而化学修饰法通常修饰蛋白质分子中的多个 Lys 残基，产生多种不定点随机修饰产物和多点修饰产物等多种产物的混合物，导致产物的不均一性和活性的降低[3]。克服这个问题的方法之一是采用酶催化法定点修饰蛋白质分子[4]。谷氨酰胺转氨酶催化定点修饰蛋白质分子是近年来的研究热点。

谷胺酰胺转氨酶（EC2.3.1.13，Transglutaminases，简称 TG）是一种催化酰基转移的酶，它能催化多肽链中谷氨酰胺（Gln）残基的γ-羧酰胺基（酰基供体）与氨基供体（酰基受体）之间进行酰基转移形成异肽键，其中氨基供体可以是一系列伯氨基化合物，也可以是肽链中赖氨酸残基的ε-氨基[5, 6]。因此，TG 可以用于蛋白质的修饰或者交联，在医药、纺织、食品生产中具有广泛的应用[7]。最早商品化的 TG 是来源于动物的，其活性需要依赖钙离子参与，来源稀少，分离纯化过程复杂。发酵法生产的微生物来源的谷氨酰胺转氨酶（microbial transglutaminases，简称 mTG）来源广泛，其活性不依赖钙离子，产量高，底物特异性强，因此在实践中广泛应用的是微生物来源的谷氨酰胺转氨酶[8]。

蛋白质分子中的 Gln 残基和 Lys 残基都是 mTG 潜在的修饰位点。本研究（1）首先在单甲氧基聚乙二醇氨（mPEG-NH_2）分子上引入 Gln 残基制备 *N*-苄氧羰基-谷氨酰胺-甘氨酰-单甲氧基聚乙二醇（CBZ-QG-mPEG），然后利用 mTG 分别催化 Cyt C 和 mPEG-NH_2（氨基供体）、Cyt C 和 CBZ-QG-mPEG（酰基供体）反应，并检测 mTG 催化 mPEG-NH_2 或 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 的可行性。（2）优化谷胺酰胺转氨酶催化修饰 Cyt C 的反应条件。（4）比较

酶法和化学法修饰 Cyt C 的反应结果。（5）最后探讨了 PEG 修饰后的 Cyt C 的性质。本研究能提出的谷胺酰胺转氨酶催化修饰法解决了蛋白质 Lys 残基难以定点修饰的难题，也拓展了 mTG 在蛋白质修饰方面的应用。

1. 材料与方法

1.1 主要试剂

谷胺酰胺转氨酶，由江苏一鸣生物股份有限公司赠送；单甲氧基聚乙二醇氨（mPEG-NH_2，分子量 5000），单甲氧基聚乙二醇丙酰琥珀酰亚胺（mPEG-SPA，分子量 5000），购自厦门赛诺邦格生物科技有限公司；细胞色素 C（猪心，Cyt C），1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)，购自苏州亚科科技股份有限公司；*N*-苄氧羰基-谷氨酰胺-甘氨酸（Carboxybenzyl–glutaminyl–glycine，CBZ-QG），L-谷氨酸-γ-羟肟酸，还原型谷胱甘肽等试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司；羟氨，购自 Alfa Aesar 公司；*N*-羟基琥珀酰亚胺（NHS），3,3′,5,5′-四甲基联苯胺盐酸盐（TMB）购自 Aladdin 公司。

1.2 方法

1.2.1 *N*-苄氧羰基-谷氨酰胺-甘氨酰-单甲氧基聚乙二醇（CBZ-QG-mPEG）的制备

参照参考文献[9]的方法制备。169 mg CBZ-QG，58 mg NHS 和 93 mg EDC 溶解于 2 mL 二甲亚砜，在室温中磁力搅拌 24 h。将 25 mg mPEG-NH_2 溶解于 1 mL 硼酸缓冲溶液（pH9.0, 0.1M）中，并与上述二甲亚砜反应液混合，继续在室温中磁力搅拌 24 h。反应完成后，溶液加水稀释至 12 mL，用超滤离心管（Millipore，Amicon® Ultra-4，截留分子量 3K）进行超滤浓缩以除去反应液中剩余的 CBZ-QG，EDC，NHS 和 DMSO。反复超滤离心，最后将超滤浓缩液冷冻干燥。

1.2.2 mTG 催化 mPEG-NH_2 或 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 的可行性研究

分别为 Cyt C 提供 mPEG-NH_2（氨基供体）和 CBZ-QG-mPEG（酰基供体），检测 mTG 催化 mPEG-NH_2 修饰 Cyt C 谷氨酰胺残基或 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 赖氨酸残基的可行性。

mTG 催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 方法：4 mg/mL 的 Cyt C 溶液 25 μL 与 15 mg/mL 的 CBZ-QG-mPEG 溶液（0.05 M，pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液）75μL 混合均匀，加入 100 μL 1 mg/mL 的 mTG 溶液启动反应。在 37°C 水浴，反应 2 h 后，取样 50 μL，加入 50 μL 的 2×SDS loading buffer 沸水浴 3min，进行 SDS-PAGE，电泳结束后，考马斯亮蓝染色，脱色后采用 Bio-Rad Gel Doc XR +凝胶成像系统对凝胶进行拍照、分析。

mTG 催化 mPEG-NH_2 修饰 Cyt C 方法同上，用 15 mg/mL 的 mPEG-NH_2 溶液代替 CBZ-QG-mPEG 溶液即可。

1.2.3 mTG 催化修饰 Cyt C 条件的优化

在可行性研究的基础上，进一步研究 mTG 浓度、温度、反应时间、pH 值对修饰反应的影响，优化 mTG 催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 的反应条件。

1.2.3.1 mTG 浓度对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

按照 1.2.2 的方法，分别用 1.0、2.0 、4.0 、8.0 、12.0 mg/mL 的 mTG 溶液（mTG 在反应体系中的终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/mL）催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C，pH8.0，37°C 下反应 2 h，取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3.2 温度对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

按照 1.2.2 的方法，分别在 17°C，27°C，37°C，47°C 进行修饰反应，其余条件不变，反应 2h 后，取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3.3 反应时间对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

按照 1.2.2 的方法，在 37°C 下修饰反应 10 min、20 min、40 min、1 h、2 h、4 h 后，其余条件不变，分别取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3.4 pH 值对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

分别在 pH4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的缓冲溶液中，37°C 下，其余条件不变，修饰反应 2 h 后，取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 化学法 PEG 修饰 Cyt C

化学法 PEG 修饰细胞色素 C 采用单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基丙酸酯（mPEG-SPA）作为活化的修饰剂。取 100 μL 2 mg/mL 的 Cyt C 溶液（0.2 M 硼酸盐缓冲液，pH 8.0）与 100 μL 0.225% (w/v) mPEG-SPA 溶液（0.2 M 硼酸盐缓冲液，pH 8.0）混匀。37°C 反应 2 h 后，加入 100 μL 甘氨酸溶液（20 mg/mL）终止反应。取样 50 μL，加入 50 μL 的 2×SDS loading buffer，进行 SDS-PAGE。

1.2.5 PEG 修饰 Cyt C 的分离

利用 Bio-Rad 蛋白层析系统 NGC chromatography system 以及 ENrich^{TM} SEC 70 柱对修饰产物进行分离。样品经 0.45 μm 针式过滤器过滤，进样量为 1 mL。使用 pH6.0，0.05M 的磷酸盐缓冲液，以 1 mL/min 的流速进行洗脱，每支试管收集 1 mL 洗脱液。

1.2.6 Cyt C 及 PEG 修饰 Cyt C 活力的测定

参照参考文献[3]的方法，稍加调整，进行活力测定。以过氧化氢和 TMB 为底物配制底物显色液（含 0.04%的过氧化氢和 0.14 mg/mL 的 TMB，现配现用）。底物显色液在 37℃水浴预热 5 min，加入 100 μL 25 μg/mL 的待测细胞色素 C 溶液。反应 5 min 后，每管加 2 mL 的 2M 硫酸溶液终止反应，测定 OD_{450nm} 的数值。空白对照为细胞色素 C 溶液先加入 2M 硫酸溶液失活，再加入底物显色液。

细胞色素 C 活力的定义：在特定催化条件下，使 OD 值变化 0.001 的酶量为一个酶活力单位。

1.2.7 Cyt C 及 PEG 修饰 Cyt C 热稳定性和酸碱稳定性的测定

Cyt C 分别在 pH 值 4.0-10.0 的缓冲溶液中放置 3 h 后，于 37 ℃下测定活力。另取新配制的 Cyt C 测定活力作为初始酶活力。以初始活力为标准，作为 100%，经缓冲溶液处理过的酶活力值与其相比计算残留活力，反映 Cyt C 的酸碱稳定性。

Cyt C 溶液分别在 17-67℃各温度下放置 3 h 后，于 37 ℃下测定活力。另取新配制的 Cyt

C 测定活力作为初始酶活力。以初始活力为标准，作为 100%，经缓冲溶液处理过的酶活力值与其相比计算残留活力，反映 Cyt C 的热稳定性。

2.结果与讨论

2.1 mTG 催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 的可行性

Cyt C 分子中含有 3 个 Gln 残基和 18 个 Lys 残基[10]，这些 Gln 残基和 Lys 残基都是 mTG 潜在的修饰位点。在 mTG 的反应体系中，分别为 Cyt C 提供 mPEG-NH_2（氨基供体）和 CBZ-QG-mPEG（酰基供体），检测 mTG 催化 mPEG-NH_2 或 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 的可行性。mTG 在 37°C，pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中分别催化 CBZ-QG-mPEG 、mPEG-NH_2 和 Cyt C 的修饰反应 2 h。反应结果用 SDS-PAGE 进行分析，结果如图 1 所示。

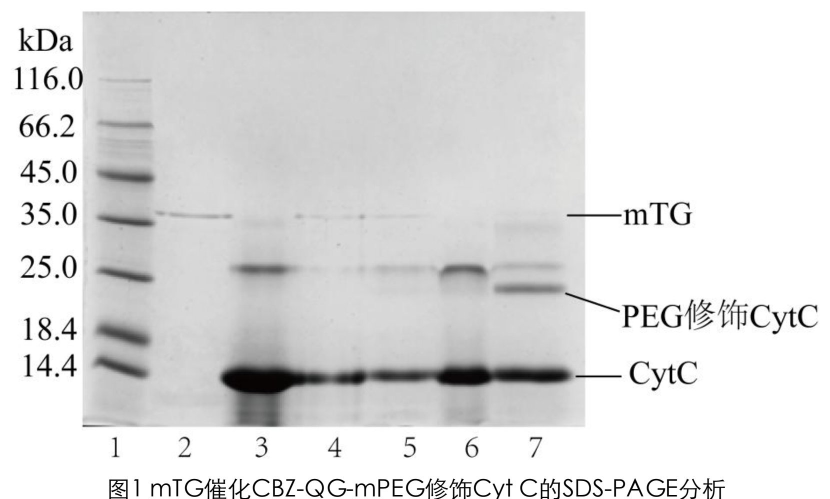


图1 mTG催化CBZ-QG-mPEG修饰Cyt C的SDS-PAGE分析

Figure 1. Image of the SDS-PAGE for the coupling CBZ-QG-mPEG to Cyt C catalyzed by mTG. Lane 1: molecular weight marker. 2: mTG, 1.0 mg/mL. 3: Cyt C, 4 mg/mL. 4: Cyt C 0.5 mg/mL+ mTG 0.5 mg/mL. 5: Cyt C 0.5 mg/mL + mTG 0.5 mg/mL+mPEG-NH2 5.6 mg/mL. 6: Cyt C 0.5 mg/mL +CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL. 7: Cyt C 0.5 mg/mL +CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL + mTG 0.5 mg/mL, 37oC, 2h.

从图 1 可以看出，mTG 的分子量约为 38.0 kDa (Lane 2)，Cyt C 的分子量约为 13.4 kDa (Lane 3)。Lane 4 中无新的电泳条带出现，说明 mTG 不能催化 Cyt C 分子自身聚合。Lane 5 中也没有新的电泳条带产生，说明 mTG 不能催化 mPEG-NH_2 修饰 Cyt C，即 Cyt C 中 3 个的 Gln 残基均不符合 mTG 的催化条件。Lane 6 中没有新的电泳条带产生，说明在没有 mTG 催化时 Cyt C 和 CBZ-QG-mPEG 不能自动发生反应。Lane 7 中，在 mTG 和 CBZ-QG-mPEG 同时存在时，新的电泳条带产生，表明 mTG 可以催化 CBZ-QG-mPEG （酰基供体）修饰 Cyt C 的 Lys 残基。经 SDS-PAGE 凝胶成像系统分析，新的修饰产物分子量约为 24.0 kDa，这个分子量相当于 Cyt C 本身的分子量（13.4 kDa）加上 CBZ-QG-mPEG (约 5.3 kDa)分子量的两倍，这个结果说明在 mTG 的催化作用下 CBZ-QG-mPEG 以 1:1 的比例修饰 Cyt C 分子。通常，PEG 修饰蛋白质之后分子量的增加值远远大于 PEG 本身的分子量，这是因为 PEG 分子中每个乙氧基会结合 2-3 个水分子导致 PEG 水化物的水动力学半径增大[4]。因此，PEG 修饰的蛋白分子在电泳中表现出来的分子量远大于蛋白质分子量和 PEG 分子量的和，一般相当于蛋白

质分子量与大约 2.5 倍 PEG 分子量的和。Scaramuzza 和 Caliceti 等也分别报道了 PEG 修饰蛋白质时相似的试验结果[4, 5]。

蛋白质分子中 Gln 或 Lys 残基所在的空间构象和邻近的氨基酸残基决定了 mTG 的底物特异性。能够被 mTG 修饰的 Gln 或 Lys 残基必需位于高度柔性的多肽链区域，而且必需完全暴露在溶剂中[11-14]。Cyt C 分子中含有 3 个 Gln 残基和 18 个 Lys 残基。Gln13 和 Gln17 位于肽链中的刚性区域，尤其是 Gln17 还被包埋在 Cyt C 分子内部。Gln43 虽然位于肽链的无规则区域，但是邻近的 Pro45 降低了肽链的柔性，阻碍了 mTG 对 Gln43 的结合。因此 3 个 Gln 残基都不能作为 mTG 选择性修饰的位点。

根据 mTG 对 Lys 残基的选择性，18 个 Lys 残基中只有四个位于肽链的柔性区域，是潜在的修饰位点，即 Lys23, Lys26, Lys28 和 Lys40。这四个 Lys 残基邻近的氨基酸残基将决定 mTG 的特异选择性。与 Lys23 相邻的 Glu22 残基带有负电荷，会降低 mTG 对 Lys23 的选择性，因为 mTG 活性中心也带有负电荷，因为静电排斥作用而不能与 Lys23 残基结合[15]。Lys40 位于肽链的无规则区域，但是没有完全暴露在溶剂中，而不容易被 mTG 结合。Lys26 和 Lys28 均位于肽链的柔性区域而且完全暴露在溶液中，Lys26 的亲水性高于 Lys28。综上分析，Lys26 是 Cyt C 肽链中最有可能被 mTG 修饰的位点。

2.2 mTG 催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 条件的优化

温度、mTG 用量、反应时间等条件都会影响酶催化反应的效率，对反应条件进行优化，提高修饰效率。

2.2.1 酶的用量对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

分别用 0.5、1、2、4、6 mg/mL mTG 催化修饰反应，研究酶的用量对修饰反应的影响，结果如图 2 所示。

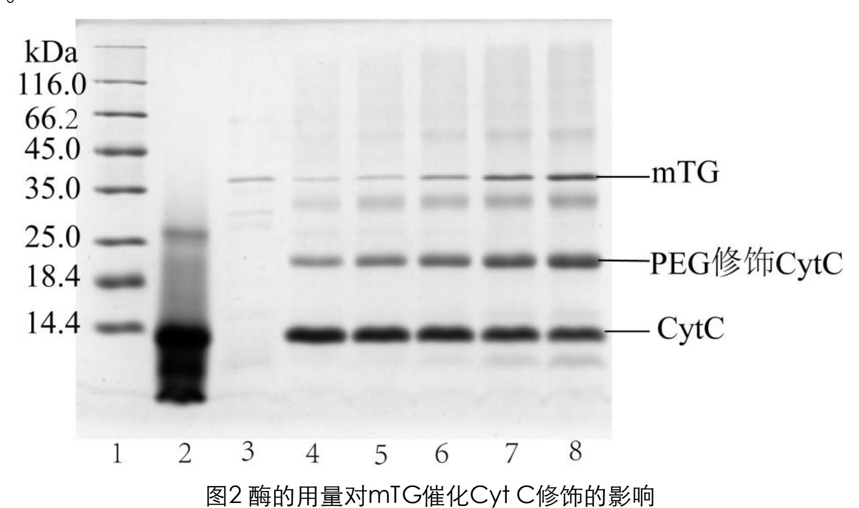


图2 酶的用量对mTG催化Cyt C修饰的影响

Figure 2 Effects of concentration of mTG on the PEGylation of Cyt C catalyzed by mTG. Lane 1: molecular weight marker. 2: Cyt C, 4 mg/mL. 3: mTG, 1.0 mg/mL. 4-8: Cyt C 0.5 mg/mL+ CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL, reaction time 2 h, temperature 37oC, pH 8.0, mTG concentration 0.5, 1, 2, 4, 6 mg/mL, respectively.

从图 2 可以看出，随着 mTG 用量增加，修饰的 Cyt C 逐渐增多，PEG 修饰率逐渐提高。但在本研究选择的 mTG 用量范围内，酶的用量的影响不是非常显著。因此，综合考虑实验成

本和转化率，选择 mTG 用量为 1 mg/mL。

2.2.2 温度对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

在 17°C 、27°C 、37°C 和 47°C 四个温度下进行 mTG 催化修饰，研究温度对修饰反应的影响，结果如图 3 所示。

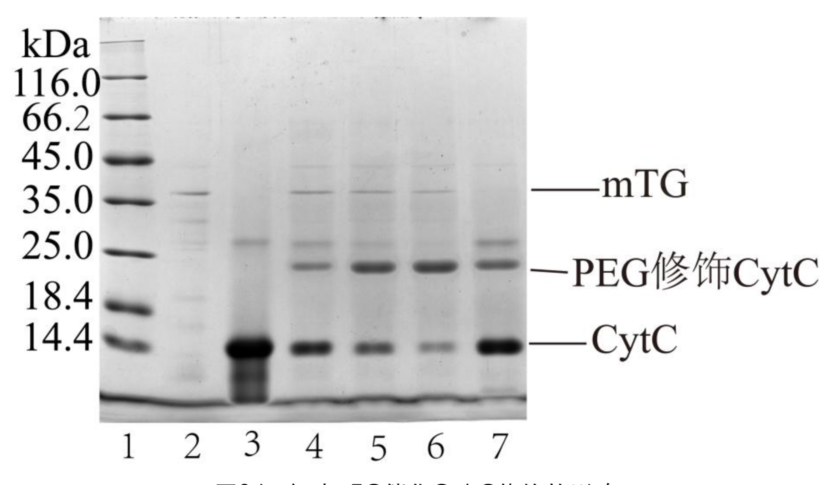


图3 温度对mTG催化Cyt C修饰的影响

Figure 3 Effects of temperature on the PEGylation of Cyt C catalyzed by mTG. Lane 1: molecular weight marker. 2: mTG, 1.0 mg/mL. 3: Cyt C, 4 mg/mL. 4-7: Cyt C 0.5 mg/mL+ mTG 1.0 mg/mL+ CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL, reaction time 2 h, pH 8.0, temperature 17 oC , 27oC, 37oC, 47 oC, respectively.

从图 3 可以看出，温度对 mTG 催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 有显著影响。随温度升高，PEG 修饰的 Cyt C 逐渐增加，剩余的 Cyt C 逐渐减少；但温度升高到 47°C 时，mTG 催化产生的修饰 Cyt C 反而减少。原因是温度过低，mTG 的活性较弱；温度过高，mTG 容易变性活力降低。37°C 是 mTG 催化修饰的最适温度。

2.2.3 反应时间对 mTG 催化修饰 Cyt C 的影响

mTG 在 37°C 温度下催化修饰反应 10 min、20 min、40 min、1 h、2 h、4 h 和 6 h，研究时间对修饰的影响，结果如图 4 所示。

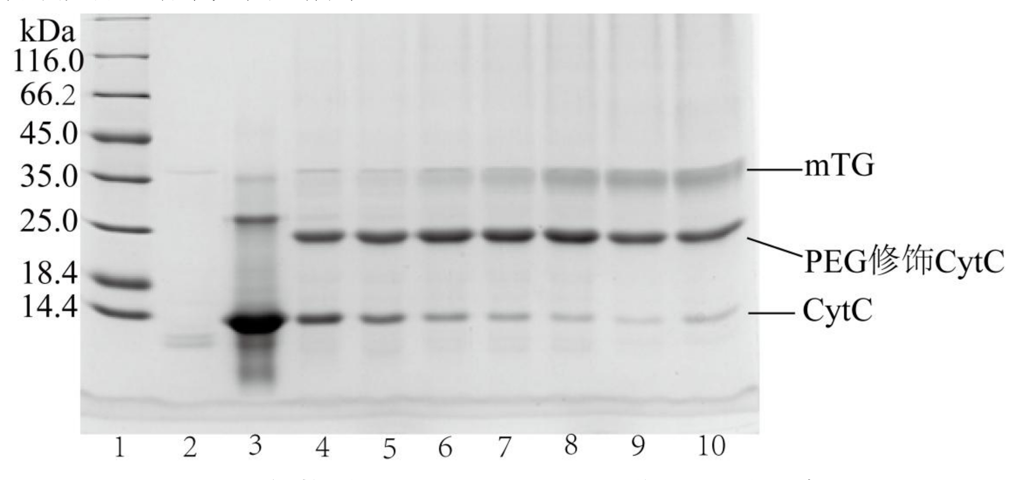


图4反应时间对mTG催化CBZ-QG-mPEG修饰Cyt C的影响

Figure 4. Effects of reaction time on the PEGylation of Cyt C catalyzed by mTG.. Lane 1: molecular weight marker.

2: mTG, 1.0 mg/mL. 3: Cyt C, 4 mg/mL. 4-10: Cyt C 0.5 mg/mL+ mTG 1.0 mg/mL+ CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL, temperature 37°C, pH 8.0, reaction time 10 min, 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, respectively.

如图 4 所示，mTG 催化修饰反应，随着反应时间的延长，PEG 修饰的 Cyt C 逐渐增加，剩余的 Cyt C 逐渐减少。反应时间在 2h 以上时，时间增加一倍（4 h）或者两倍（6 h），Cyt C 的修饰转化率变化并不显著，而且延长时间会导致变性蛋白质的增多。因此，综合提高修饰转化率和缩短反应时间的考虑，确定反应时间为 2 h。

2.2.4 pH 值对 mTG 催化 CBZ-QG-mPEG 修饰 Cyt C 的影响

mTG 在 37°C 温度下催化修饰反应 2 h，反应体系的 pH 值在 4-9 范围内改变，研究 pH 值对修饰反应的影响，结果如图 5 所示。

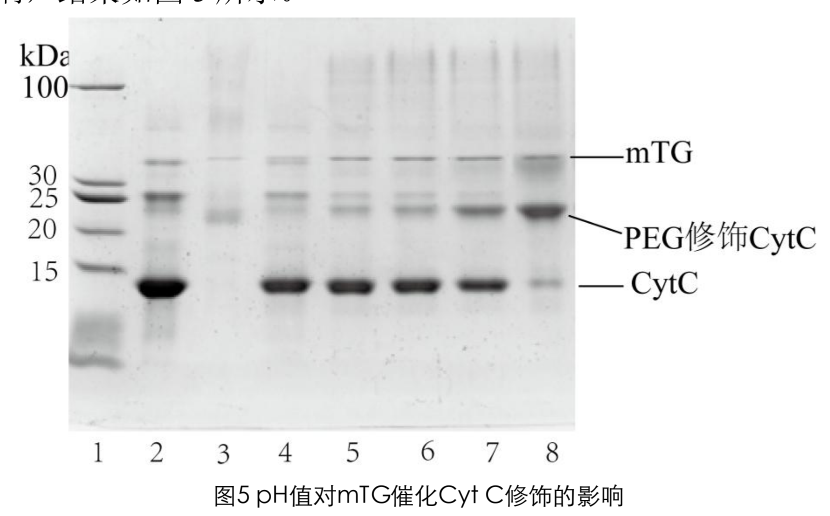


图5 pH值对mTG催化Cyt C修饰的影响

Figure 5 Effects of buffer pH on the PEGylation of Cyt C catalyzed by mTG. Lane 1: molecular weight marker. 2: Cyt C, 4 mg/mL. 3: mTG, 1.0 mg/mL. 4-7: Cyt C 0.5 mg/mL+ mTG 1.0 mg/mL+ CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL, reaction time 2 h, temperature 37oC, buffer pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, respectively.

如图 5 所示，pH 值对 mTG 的催化反应影响显著。随着反应 pH 值的升高，PEG 修饰转化率逐渐提高，尤其是 pH8.0 时 mTG 催化修饰 Cyt C 转化率最高。溶液 pH 值会影响底物及酶活性部位上基团的解离，从而影响酶与底物的结合，最终影响酶活性的表达。因此，选择溶液 pH 值 8.0。

综上考虑，最佳修饰反应条件为：1 mg/mL 的 mTG，37°C 温度下，pH 值 8.0 的溶液中，催化修饰反应 2 h。

2.4 酶法和化学法 PEG 修饰 Cyt C 的比较

化学法PEG修饰CytC采用单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基丙酸酯（mPEG-SPA）作为活化的修饰剂修饰CytC，然后进行SDS-PAGE分析比较酶法和化学法PEG修饰CytC的差别，结果如图6所示。

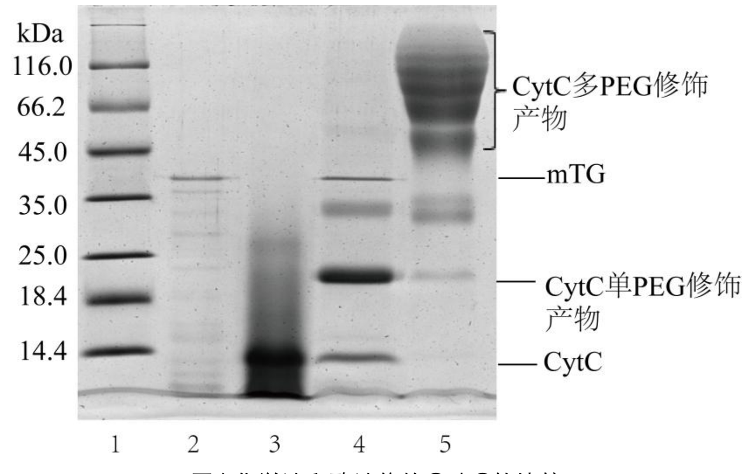


图6 化学法和酶法修饰Cyt C的比较

Figure 6. Image of the SDS-PAGE for the comparison of enzymatic and chemical PEGylation of Cyt C. Lane 1: molecular weight marker. 2: mTG, 1.0 mg/mL. 3: Cyt C, 4.0 mg/mL. 4: the enzymatic PEGylation of Cyt C, CBZ-QG-mPEG 5.6 mg/mL, Cyt C 0.5 mg/mL, mTG 0.5 mg/mL, 37°C, 2h. 5: the chemical PEGylation of Cyt C, mPEG-SPA 11.2 mg/mL, Cyt C 1.0 mg/mL, 37°C , 2h.

从图6中可以看出，酶法催化修饰反应2 h后，Cyt C的条带消失，只有一个新的产物条带产生（如Lane 4所示），说明修饰产物只有一种。而化学法修饰反应2 h后，Cyt C的条带消失，但是在分离胶的顶端产生了一个很宽的产物条带（如Lane 5所示），说明Cyt C中有多个Lys残基位点与mPEG-SPA反应，导致修饰Cyt C的分子量与Cyt C相比大大提高，而且产生了不同修饰度的不均一修饰产物。与化学法相比，很明显可以看出，mTG催化的修饰反应的优势是修饰位点的高特异性和产物的均一性。

2.5 修饰 Cyt C 的性质

测定了 PEG 修饰后 CytC 的活力、稳定性等，并分别与天然 CytC 比较。

2.5.1 PEG 修饰对 CytC 活力的影响

传统的化学法修饰是对蛋白质分子中多个赖氨酸残基随机修饰 PEG，会造成活性蛋白质的活力下降。本研究采用酶法对 CytC 进行定点修饰，通过比较修饰前后 CytC 的活力变化可以反映这种修饰对其活力的影响。

表 1 Cyt C 和 PEG 修饰 Cyt C 的活力比较

Table 1 Activities of CytC and PEGylated CytC

	Relative activity /%
CytC	100
Modified CytC	148±3.3

从表 1 中可以看出，修饰后 CytC 的活力没有降低，反而会大大提高。说明酶法对 Cyt C 特定位点赖氨酸残基的定点修饰不影响其活性的表达。另外，PEG 的两亲性使得 TMB 分子更容易通过扩散作用进入 Cyt C 活性中心的底物结合位点，使其催化速度提高。

2.5.2 PEG 修饰 CytC 的热稳定性

一般，大分子修饰后，蛋白质的稳定性会有改善。PEG 修饰后的 CytC 在各 17-67°C 温度下保温处理，测定其热稳定性，结果如图 7 所示。

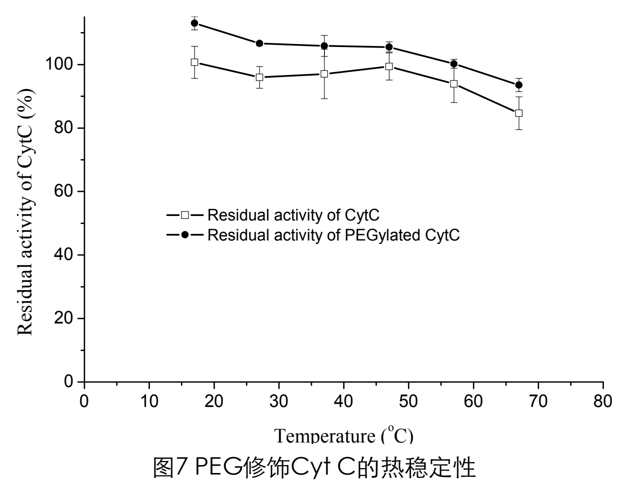


图7 PEG修饰Cyt C的热稳定性

Figure 7 Thermal stability of PEGylated Cyt C.

从图 7 中可以看出，热处理后，修饰 Cyt C 的残余活力比较高，与天然 Cyt C 相比，修饰后 Cyt C 的热稳定性有所提高。这种提高可能是由于 PEG 长链与 Cyt C 共价结合后，长链分子覆盖在 Cyt C 表面，减少了热变性作用。

2.5.3 PEG 修饰 CytC 的酸碱稳定性

PEG 修饰后的 CytC 在 pH4-9 的缓冲溶液中浸泡处理 3 h，测定其酸碱稳定性，结果如图 8 所示。

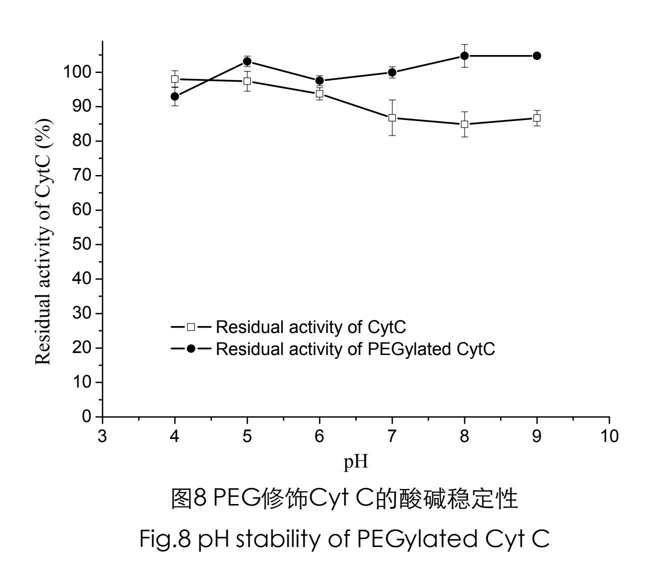


图8 PEG修饰Cyt C的酸碱稳定性

Fig.8 pH stability of PEGylated Cyt C

从图 8 中可以看出，修饰 CytC 经缓冲溶液处理 3h 后，残余活力比未修饰的 CytC 要高，说明 CytC 经过 PEG 的修饰后 pH 耐受性有明显的提高。

3 结论

mTG 不能催化 mPEG-NH_2 修饰 Cyt C 分子，但 mPEG-NH_2 末端引入 CBZ-QG 后生成的

CBZ-QG-mPEG，可以作为 mTG 的酰基供体，在 mTG 的催化作用下，与 Cyt C 的赖氨酸残基的氨基发生共价结合，而且基于 mTG 的底物特异性实现了 PEG 定点修饰 Cyt C。酶法催化 PEG 修饰 Cyt C 只产生单一产物，而化学法 PEG 修饰 Cyt C 产物复杂，是多种多点修饰产物的混合物。谷胺酰胺转胺酶催化修饰法解决了蛋白质 Lys 残基难以定点修饰的难题，拓展了 mTG 在蛋白质修饰方面的应用。

参考文献

1. Vazquez-Duhalt R. Cytochrome c as a biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 1999, 7(s 1–4):241-249.
2. Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Enzyme & Microbial Technology, 1998, 22(1): 8-12.
3. Scaramuzza S, Tonon G, Olianas A, et al. A new site-specific monoPEGylated filgrastim derivative prepared by enzymatic conjugation: Production and physicochemical characterization. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2012, 164(3): 355–363.
4. Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55(10): 1261-77.
5. Djoullah A, Krechiche G, Husson F, et al. Size measuring techniques as tool to monitor pea proteins intramolecular crosslinking by transglutaminase treatment. Food Chemistry, 2016, 190: 197-200.
6. Jian QZ, He T, Jian WW. The microbial transglutaminase immobilization on carboxylated poly(*N*-isopropylacrylamide) for thermo-responsivity. Enzyme & Microbial Technology, 2016, 87-88:44-51.
7. Djoullah A, Sok N, Djemaoune Y, et al. Monitoring of transglutaminase crosslinking reaction by 1 H NMR spectroscopy on model substrates. Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects, 2015, 475(1): 69-74.
8. Gundersen MT, Keillor JW, Pelletier JN. Microbial transglutaminase displays broad acyl-acceptor substrate specificity. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 98(1): 219-230.
9. Zhou JQ, He T, Wang JW. PEGylation of cytochrome c at the level of lysine residues mediated by a microbial transglutaminase. Biotechnology Letters, 2016, 38(7):1-9.
10. Everse J, Liu CJJ, Coates PW. Physical and catalytic properties of a peroxidase derived from cytochrome c. Biochimica Et Biophysica Acta, 2011, 1812(9):1138-1145.
11. Jeger S, Zimmermann K, Blanc A, et al. Site-Specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase. Angewandte Chemie, 2010, 49(51): 9995–9997.

12. Sato H. Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54(54):487-504.
13. Sato H, Hayashi E, Yamada N, et al. Further studies on the site-specific protein modification by microbial transglutaminase. Bioconjugate Chemistry, 2001, 12(5):701-710.
14. Hu BH, Messersmith PB. Rational design of transglutaminase substrate peptides for rapid enzymatic formation of hydrogels. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(47):14298-14299.
15. Spolaore B, Raboni S, Ramos Molina A, et al. Local unfolding is required for the site-specific protein modification by transglutaminase. Biochemistry, 2012, 51(43): 8679-8689.